

## 第2回エクソソームを含む細胞外小胞（EV）を利用した 治療用製剤に関する専門部会

日時	令和3年10月4日(月) 14:00～
開催形式	ウェブ会議

<開会>

- 事務局（澁岡先端技術評価業務調整役） 定刻になりましたので、「第2回エクソソームを含む細胞外小胞(EV)を利用した治療用製剤に関する専門部会」を開催させていただきます。本日はお忙しい中、お集まりいただきましてありがとうございます。

<委員出席状況報告及び配付資料確認等>

- 事務局（澁岡先端技術評価業務調整役） 委員の出席状況を申し上げます。当専門部会の14名の委員のうち、現在、全員に出席いただいております。全委員の過半数に達しておりますので、専門部会規程第7条の規定に基づき、本専門部会の成立を御報告いたします。

次に、配付資料の確認をさせていただきます。議事次第・資料目録、資料取扱区分表、資料1、資料2、資料3、参考資料1と参考資料2がございます。資料に不足などございましたら、事務局までお申し付けください。

次に、資料取扱区分表を御覧ください。資料は内容に応じまして、取扱いとして「厳重管理」、「取扱注意」、「その他」と分類いたしまして、それぞれに応じた対応を取ることとしております。本日の資料1と資料2は「取扱注意」のため厳重に保管いただいております。コピー等の複製、第三者への開示は御遠慮くださるようお願いいたします。資料3、参考資料1、参考資料2は「その他」に該当いたしますので、委員各自で適切に、保管・管理・廃棄をお願いいたします。

今回はWeb会議でございますけれども、音声につきましては、通常はハウリングを防ぐためにミュートの状態としていただきまして、発言する際に有効としていただきますようお願いいたします。また、今回は録音から文字を起こして議事録を作成いたします。速記業者の録音ではないため、議事録確認の際に先生方の御協力を頂く部分があるかと存じます。この点、先におわびいたします。よろしくようお願いいたします。

それでは、高倉部会長、議事の進行をお願いいたします。

<委員からの講演と意見交換:>

「マウスPOCからヒト創薬へー細胞傷害性T細胞（別称：CTL、キラーT細胞、活性化CD8<sup>+</sup>T細胞）EVを例にー」（瀬尾委員）>

- 高倉部会長 どうもありがとうございました。皆さん、本日は御出席どうもありがとうございます。それでは、議事の案に沿って進めさせて

いただきたいと思います。

まず、議事1「委員からの講演と意見交換」ということで、第1回では落谷先生のほうから御講演いただき、いろいろと勉強させていただきましたけれども、更に課題を抽出するために、本日はエクソソーム製剤臨床開発に関しまして2人の委員から御講演いただこうと思います。

まず、1人目は瀬尾委員です。講演のタイトルは「マウスPOCからヒト創薬へー細胞傷害性T細胞（別称：CTL、キラーT細胞、活性化CD8<sup>+</sup>T細胞）EVを例にー」です。それでは、瀬尾先生、よろしくお願いたします。

○瀬尾委員

キラーT細胞、別称がCytotoxic T lymphocyteとか、活性化CD8陽性T細胞とか言いますが、今回はCTLということで話をさせていただけたらと思います。実際に創薬に向けて、非臨床の安全性試験に行く手前ぐらいまで行っていますので、マウスの実験結果から、要はどういう粒子であるかということ、どういうエクソソームなのか、マイクロベシクルなのか、これらの粒子をどのように毎回同じように製造していくかということで、それができて初めて非臨床の試験に移れるわけで、そこに至るまでに結構長い時間を使っています、今日はそんなお話をさせていただきます。

次をお願いします。私の所では、キラーT細胞、CTLのエクソソームというか、EVですね、超遠心で調製したEVが、どういう役目を持つのかということで、マウスを使った実験をずっとやっています、それを腫瘍内に投与し、そしてその後どういう変化が現れるかというのをずっと調べております。

次のスライドをお願いします。分かってきたことは、キラーT細胞のEVは、がんの特異的であろうと、特異的でなかろうと、CD8陽性の活性化したCTLは、腫瘍の中では間葉系の細胞、CD140aとか、Sca-1<sup>+</sup>の間葉系の部分とか、あとは間葉系の中でもER-TR7というのはFibroblastのマーカーですけれども、それと、 $\alpha$ -SMAというのを持っているCAFという部分に注目して写真を撮っていきますと、CTL EVを入れてから約3日後には、そういう悪性化したような、FibroblastとかCAFがいるような所がなくなっているというような実験結果を得ました。これは、in vitroでも同様の結果が得られていまして、in vitroに間葉系の細胞を培養しておきまして、そこにEVを入れるという操作だけで、間葉系の細胞が死んでいきますし、その間葉系の細胞が死ぬ機序の1つとして、

miR-298-5p というのが関わっているのではないかというところまで分かっています。

そして、この間葉系の細胞は CTL の EV を入れた時点でなくなっていくわけですが、それがどうしてかということになると、そのどうして間葉系細胞だけがなくなっていくかということの大きな理由としては、蛍光を使った EV を用いた研究によって分かってきています。腫瘍の中では、EV というのは、これも腫瘍に特異性があるとなかろうと関係ないのですが、間葉系の細胞を含む部分にしか入らなくて、間葉系細胞を除くがん細胞が主にいるだろうという部分に全く入らないという事実があって、こういう事実、取り込まれやすさを利用してその細胞を殺していることが分かっております。

次のスライドをお願いします。間葉系の細胞、特に CAF というのは、TGF- $\beta$  とか、そういうものを出して、腫瘍、がん細胞を上皮系の細胞から間葉系の細胞に転換させて、浸潤や転移をしていくという大きな役割を果たしていますので、間葉系の細胞がなくなったら、当然がん細胞の浸潤や転移性が下がるかということで実験してみますと、確かに皮下移植腫瘍の中に EV を入れるということをするだけで、間葉系細胞はなくなっていくし、その周りで浸潤も起こらなくなって、1か月以上経った後の転移も起こらないという結果が得られました。

次のスライドをお願いします。CTL の EV というものがどのように役目を果たしているかということ、もっと詳細な実験があって、CTL というのは、腫瘍の中でも新生血管部分というものが間葉系細胞がいる所にできるのですけれども、そういう所に入って行って、そこで EV を放出することによって、間葉系細胞を傷害し、その傷害によってがん細胞が進行性を失うということが分かってきたわけですね。この結果を用いて、ヒトへの応用ということを考えてまいりました。

次のスライドをお願いします。ヒトにも同じような作用があるのかというのはなかなか見づらいので、その実験系を立てるのが結構大変でして、1つは *in vivo* の実験系というのを立てました。今は腫瘍内に投与しているだけなので、実際に腫瘍に投与するのではなくて、全身に投与するとどうなるかという実験もやっております。その結果をお見せしますので、次のスライドをお願いします。これは全身投与でやっても CTL EV は転移の抑制をすることができます。

次のスライドをお願いします。これは、全身投与した CTL の EV がどういう所に集まっているかというのを見たものです。肝臓にはかなりたくさんの蛍光が、蛍光 EV を打ちますと見られるのですけれども、そのほかに脾臓にも見られますし、肺にも見られるということで、EV というのは、もしかしたら全部のポピュレーションではないですけれども、全身にちゃんと流れているものがあるということが分かってきております。当然、全身に流れるということは、EV で創薬する場合にはマウスモデルを用いるしかないと思うのですけれども、病理的な全身の観察は必要だろうというふうに思います。

次のスライドをお願いします。全身投与したものが、がんはどう影響するかということも分かっております。

次のスライドをお願いします。これが全身投与した、これは超遠心で落とした EV ですけれども、当然腫瘍にも入ることが分かってきました。入るのですけれども、入り方というのは、やはり相当量入れてあげなくては駄目だということは分かってきました。腫瘍の中の間葉系細胞、CAF を含んだ間葉系細胞に入っています。ですが、腫瘍内投与したものに比べると、やはりちょっと少ないというような感じになっています。

次のスライドをお願いします。腫瘍の中のどういう細胞に入っているのかというのを細かく調べると、腫瘍内投与した場合にはあまり気付かなかったのですけれども、間葉系細胞に取り込まれるものと、腫瘍の血管、内皮細胞に取り込まれるものがある、そういうものがほとんどであるということ、そして、腫瘍部分、がん細胞がいる部分には、ほとんど取り込まれないということも全身投与で明らかになっています。

次のスライドをお願いします。このようにマウスで得られた EV ですが、これをきちんと調べてみると、EV の中で全身に行くものと、全身に行かないものもありそうだとということで、そういうものをきちんと調べるには、エクソソームという、多胞性のエンドソーム、後期エンドソームに由来する粒子と、それから plasma membrane に由来する粒子というものを分ける必要があるというふうになります。

より、きちんとしたものを集めるようにしてこないと、毎回同じ機能を持った EV を取ってくるのは難しいだろうということで、私の所ではイオン交換を使った調製法というのを始めました。このイオン交換というのをを使って、EV の電荷によって分けていくわ

けですが、この電荷の違いを予測させるようなデータも過去の違う人たちの論文にありまして、それでやろうと思ったわけです。このときに非常に重要なのは、培養上清を限外濾過フィルターにかけることです。実は、培養上清の中には雑多ないろいろな、LDLであるとか HDL であるとか、そのほかにも粒子があって、そういう余計な粒子をなるべく除去した上でイオン交換をするということが重要で、その際に必要な限外濾過カラムというのをずっと調べていまして、これで1年半ぐらい掛かってしまっていました。一番良かった限外濾過カラムというのが、このスペクトラム社、今はスペクトラム社とは言わないようですが、その中の D02-E750-05 でした。750kDa、粒子の直径でいうと 50nm 以下をカットする、取り除くというカラムでやると、培養上清中の EV はほとんどいなくならず、数値にして表したこともあるのですが、99% ぐらいの EV は残って、直径 50nm 以下の汚い凝集物は除かれるということが分かって、その後にイオン交換に掛けるということをやりました。

次のスライドをお願いします。そうしますと、目論見どおり細胞膜由来の EV と、後期エンドソーム由来の EV というのは、膜の負電荷に違いがあることが分かりまして、それで分けることができます。そして、それをイオン交換といっても、これは DEAE-Sepharose ですが、その中でも塩濃度で EV を落としてくるのですけれども、0.3M の塩濃度の所で切ると、2つのフラクションがきれいに分かれるということが分かってきました。これはあまり細かくは申しませんが、最初のほうで低い塩濃度の所に出てくるのがエクソソームであって、高い所の塩濃度で出てくるのがマイクロベシクル様だということが分かって、実際にウェスタンブロッティングや、プロテオーム解析をやって、明らかに前者がエクソソームであって、後者がマイクロベシクル様の粒子であるということが証明できています。

実際に CTL EV の中で、実はエクソソームとマイクロベシクルのどちらが本当に機能を持つのかというのを調べたものが一番下の写真になります。機能を持つのは明らかにエクソソームで、マイクロベシクル様のほうには入っていなかったということが分かりました。目指している創薬の観点からいうと、低塩濃度で落ちてくる EV を取ってくれば、エクソソームであり、機能を持つだろうということが分かったわけです。

次のスライドをお願いします。そして、このイオン交換で分けるという方法で、ヒトの場合に、例えば少し違うデータが出てき

ていることがあります。また、がん細胞はエクソソームにも放出制御に何か違いはあるのか、うまくいかないことがこの方法では結構あるのですけれども、正常な細胞ですと大体塩濃度で分かれることが分かっています。前者の低塩濃度の所に落ちてくる粒子、EV というのはエクソソームであって、この場合、私が調べているのでは間葉系細胞の傷害活性があって、だから面白いことに、有用な miRNAs、3桁番号以下と Let-7s を持つようなものは全部前者に来て、4桁番号で GC の含量が多いのは全部高塩濃度のマイクロベシクル様の方に落ちてきます。

マイクロベシクル様のほうは、コアヒストンタンパク質とか、GAPDH とか、Actin とか、結構マイクロベシクルで知られているタンパク質が全部高塩濃度に入ってきます。それから、DNA というのも全くエクソソームに入っていないくて、マイクロベシクルのほうに入っているというのは、今後ヒトでも、PBMC EV でも全部、いつも同じ結果が得られると思います。こういう分け方で、よりきれいな、より有効なものを高濃度で得るという方法を確立してまいりました。

次のスライドをお願いします。エクソソームというものの性質を知る上で、実際にどれぐらい安定性があるのかということも、ある程度は調べております。エクソソームというものは融解にはそんなに弱くはありません。大体3回凍結融解して、3割程度の粒子がいなくなるというのが分かっています。それから、長期安定性試験で見て、4℃で2週間とか3週間だと機能を維持していますが、1か月だともう機能がないというのがエクソソームの特徴であります。-80℃ですが、これはただ単にあっただのを一回融解してみたものですけれども、100何日経っても、-80℃だとずっと機能を維持しているということも分かっています。

次のスライドをお願いします。このような取組で、実際に粒子の活性を落とさずに、きちんとした粒子であることをイオン交換法で言いつつ、その粒子がきちんとヒトで応用するためにどういうことをやっていったらいいのかということを探るといことになります。ヒトの場合に、特に重要なのは培養上清を得る過程で、ここで良い培養ができなかった場合には良いエクソソームが取れないということがあります。それが取れたときに初めて、限外濾過法とイオン交換法を組み合わせる GMP 調製をしようということになります。それで、初めて製造、CTL の EV のヒトを含めた創薬の道が開かれるというふうに思います。良いエクソソームかど

うかというのをヒトで評価するのに、活性の評価法をどのように定めたら良いかということがあります。常に生物活性を見るというのもなかなか難しいことなのかもしれませんので、実際は miRNA とか、そういうものを指標に、ちゃんとそれが良い機能を持つ EV、こういう分子がたくさん入っているから大丈夫だというような指標作りも結構重要です。そういう指標作りをやっていこうというふうに感じています。

次のスライドをお願いします。培養法は、Prodigy とか、高級な培養法というのは結構やってきたのですが、やはり培養上清を取るという点において、どれもこれも優れていません。やった中で、最も優れていて最も簡単でというので、今後私が採用していく方法は、実は G-REX というものを用いた方法です。これは、附着性細胞はあまり効果がないかもしれませんが、リンパ球とか浮遊性の細胞に関しては大きな効果があるという大変有用な培養装置です。例えば、ヒトの場合ですと、血液を取って、そこから末梢血単核球を集めてきて、そこから培養を始めるという、その培養を始めるところから有用なエクソソームを取るのに 1 週間程度は全く何もしないでいます。その細胞を入れて培養液を何リットルか入れて、あとは何もなくていいという操作でして、実はこの方法はあまりにも有用なのでびっくりしているのですが、これは EV の数ではなく、リンパ球の数だけでいっても、見えているこの培養液が入った装置だけで、大体  $5 \times 10^9$  ぐらい取れます。細胞で  $5 \times 10^9$  というと、なかなか大変なものでして、その細胞から出る EV の培養上清というのを集められるということで、しかも完全静置の培養法でして、培養した後には上のほうから培養液を取って行って、全部取ってしまうと細胞が入ってきてしまうので、大体 9 割ぐらい取ると細胞も入らないで、まあまあきれいな培養上清を得られるという方法です。その方法で取った EV を限外濾過にかけてイオン交換しますと、下の図にありますように、CD81 の多いエクソソーム様のものが低塩濃度の所に落ちてきて、そのほかの場合は、この培養法でやるとマイクロベシクル様のものがあまり取れてこないのですけれども、ちゃんとそういうものと分かれて出てきます。なので、その Fr. 17 と定義した部分を取ってくると、常に同じ EV が取れてくるだろうという話です。

次のスライドをお願いします。それで、その活性を見るのにどのような方法を用いたかということです。これも 1 年 2 年、こんなことばかり考えて、論文にならないような話ばかりやっていたの

ですが、結局どういう方法でやってもなかなかうまくいかないというのがあって、最終的にこれがうまくいくという方法が、*in vitro*のスフェロイドを使った試験です。ヒトのがん細胞とヒトのCAF若しくはヒトのMSC、MSCだとあまりうまくいかないのですが、CAFですね、これは前立腺がんのCAFを常に供給できるシステムというのを開発しまして、それによってできるわけですが、がん細胞にCAFを入れてスフェロイドを作って、それにEVを添加します。今、言ったようなイオン交換で取れてきたEVを添加すると、下ののように、培養日数によって良いEVというのは決まっています、これはマウスでもそうなのですけれども、2週間培養して上清があっても、ほとんど良いEVが出てこないけれども、少し分かりにくいかもしれませんが、551というのは培養液の種類の名前で、その右側にRPMIと書いてあるもの、それが一般的なRPMIにして、GT-T551というタカラバイオから出ている培養上清を使っているということです。それで、1〜7日とか1〜10日の培養上清を使ったときには、きれいにスフェロイドはなくなるので、そういうものを使って、ちゃんと活性を持つEVを使用していくということです。

次のスライドをお願いします。*in vitro*も大変重要な試験法として今一番重視していますが、*in vivo*も、これも重要な試験法として、皮下移植、ヌードマウスの皮下にヒトの細胞を、ヌードマウスでも移植できるヒトの細胞というのかなり分かっていますので、そういう細胞を用いて、この場合に使っていたのは培養したMSCですけれども、それを混ぜて皮下移植しました。そうすると、混ぜないときよりも少し増殖が上がります。それが緑の線です。良いエクソソームと一緒に混ぜて投与したものであるというのは赤い線になりますが、普通の増殖に戻っていくということで、この方法は実は一番良い方法なのかもしれないのですけれども、ちょっと手間が掛かるので、*in vitro*の試験法も併用します。これらにより、良いエクソソームの判断は、この*in vitro*と*in vivo*の試験をすれば良いということになります。

次のスライドをお願いします。今後の課題としまして、GMPの製造法をきちんと文書化して確立して、それを非臨床の安全性試験に持っていきたいということです。

次のスライドをお願いします。この安全性試験をやる上でどうすることが必要かということ、一番最初にありますように、どうもエクソソームというのは全身を循環するという性質がありそうなので、全身への影響というのはやるべきです。だけれども、私

たちの所では、個々の患者さんからエクソソームを取ってきて、それで治療をしよう、使おうという話、パーソナライズドの治療法を考えていましたので、安全性試験に、その患者さんがもともと持っている細胞から出てきたエクソソームの使用に、それほどあまり危険性があるかなということもありますけれども、我々の場合でも、一応得られるエクソソームについては、そういう安全性、各器官への影響、反復投与の影響など、どのぐらいの量を打ったら、どのぐらいの数の粒子を打ったら、どういう影響があるかは調べております。

安全性試験が終わりましたら、ファースト・イン・ヒューマン試験に入りますけれども、その場合には膵がんとか前立腺がんを考えていまして、それも腫瘍内投与にすると安全性という面でも保たれますので、腫瘍内投与を基本にやっていくというのが、今のところ考えていることです。EVの性質を、マウスのPOCをかなり固めた上で、ヒトでどういう性質を持っているのかをちゃんと検討し、それを毎回同じように作っていくという過程がいかにかに時間が掛かるかということをお知らせしたいと思い、今日はお話しさせて頂きました。どうもありがとうございました。

○高倉部会長 瀬尾先生、興味深いお話をどうもありがとうございました。この専門部会で議論する話題についてのヒントが随分と入っていたと思います。そうしたら、今の瀬尾先生の御発表に関して質問等がありましたら、どうぞよろしくお願いします。

○黒田委員 黒田です。

○高倉部会長 黒田先生、どうぞ。

○黒田委員 瀬尾先生、素晴らしい発表をありがとうございました。特に、EVとエクソソームの違いが明瞭に分かれていて、非常に感銘を受けました。私も、植物のエクソソームを使って、特に同じように限外濾過を使って、工業的にやろうと思っているところもあるのですが、それとは別に、先生の研究的なところでお伺いしたかったのですが、最初のスライドのほうで、特異的なEVというのは、どういうEVなのでしょう。

○瀬尾委員 がんの特異的なEVかどうかというだけです。細胞から得られたEVかどうかということです。

○黒田委員 がんから取られたということでしょうか。

○瀬尾委員 そうです。

○黒田委員 共存しているリンパ球からでしょうか。

○瀬尾委員 そうではなくて、うちの教室では、あるがん細胞に対して、そ

の抗原の認識する TCR をトランスジェニックしたマウスがいたりして、そのようなものから持ってきたものを、がんを使うときには、特異的な細胞から取ってきた EV と言っています。そうではない、ただの BALB/c の皮細胞から取ってきた EV のことは非特異的なという感じで言っています。

○黒田委員 分かりました。とすると、例えば Personalized Medicine を試みる場合には、ある程度がんを持っている方には特異的なエクソソームもあるという認識でということですね。

○瀬尾委員 特異的でなくても、間葉系の細胞を殺すことが分かっていますので、特異性の有無に関わらず有利な状況をなるべく作るということです。

○黒田委員 また、EV を投与する際は、免疫チェックポイント阻害剤の併用も必要になるのではないのでしょうか。

○瀬尾委員 それもあるかもしれません。

○黒田委員 それから、培養のときに無血清とかを使われているのですか。

○瀬尾委員 無血清というか、血漿を 3% 入れていたりします。

○黒田委員 例えば、これから臨床をやっていくときに、その辺が何か問題になってくるようなこともありますでしょうか。

○瀬尾委員 一応自己血漿でやろうというのは、その辺の問題も回避しようということで、患者さんの取ってきた血漿を使ってやろうということでやっているのですが、それほど問題にならないかもしれないですが、例えばこの専門部会で細胞の調製として望まれているのは MSC なので、MSC の場合にはやはりそれは問題になると思います。

○黒田委員 無血清というところは、すごくポイントになると自分では思っているのです。

○瀬尾委員 はい。

○黒田委員 分かりました。先生、ありがとうございました。

○高倉部会長 ほかにいかがでしょうか。

○華山副部会長 華山から質問させていただきます。

○高倉部会長 よろしく申し上げます。

○華山副部会長 先生、素晴らしい御発表ありがとうございます。EV の治療薬の大量調製法というのは、素晴らしい方法を見つけられたなど思っているのですが、この方法というのは、世界的にそういった導入がされていないのかとか、あと、今後特許で申請されて、どういった形で皆さんが使うことができるのかとか、その辺りの展望をお教えいただけますでしょうか。

○瀬尾委員 実は EV ではなくて、EV というのはウイルスと似ているので、ウ

イルスでイオン交換を使うという方法は結構やられていまして、その場合には、ウイルスの入った培養上清をそのままということが多くて、限外濾過を通すという最初の工程が重要だと思っているのですが、なかったり、そういうことが結構あります。実際には、こちらでは調製法に関しての特許を申請はしていますけれども、今のところ、まだ、そういう何か反論みたいなことはなくて、今後どうなっていくのかなと思っているのですが、うまくそれで特許が取れれば、この調製法を有効に皆さんに使いやすいようにしていけたらと思っています。

○華山副部長 あと、もう1点、限外濾過はどうしてもフィルターが目詰まりが懸念されるのですが、今年の5月ぐらいに、Nature Methods から、フィルターを揺らすと目詰まりが起らないというような報告がされており、そういったことも含められると非常に良い方法ができるのではないかなと思いました。

○瀬尾委員 そうですね。だけど、例えば私たちがやろうとしているのは、腫瘍内投与の少量のEVでやろうとしているのですが、その場合に必要なEV量というのを何十リットルも培養しなくてもいいので、その中で限外濾過膜という、先ほど名前をお見せしましたが、あれを使うと詰まるなどということは1回もないのです。

○華山副部長 ありがとうございます。

○高倉部長 ほかにいかがでしょうか。

○一木委員 一木ですが、よろしいでしょうか。

○高倉部長 どうぞ。

○一木委員 15ページ、機能を持つCTL EX0、違いをまとめられた所ですが、素晴らしいなと思いました。ここで評価の軸になる指標を幾つも挙げていただいているのですが、この中で非破壊的な指標になるのは、一番下の負のゼータ電位値というものになるかなと思います。この図の見方ですが、負のゼータ電位値で、これは右に行くほどマイナスが大きいということですか。ほどほどの負の電位を持っているものの方がいいということでしょうか。

○瀬尾委員 そうですね。ほどほどで、どちらかというと低いほうがいいという。

○一木委員 ありがとうございます。この場合に、こういった指標が、先ほど知財の話もありましたが、こういう範囲のゼータ電位を持っているエクソソームなどという、そういう技術の規定の仕方というのは可能なのでしょうか。要するに、論文とかでは、エクソソームはこのぐらいの値を取っているとか、そういう文献がたくさん

あって、先行事例のようなものが見つかります。そうすると、特許でゼータ電位の範囲を規定した請求項を権利化しようとしても審査官からは拒絶されやすい印象もありますが、その辺りはいかがですか。

○瀬尾委員　　私が思うには、ゼータ電位測定というのは、実は塩濃度でも全く違って来るし、あとは、粒子の数でも、それをきちっと合わせるとというのは意外に重要で、一定した値が出るのに苦労したのです。だけれども、こちらが大きくて、こちらが少ないみたいなのはいつも出るので、それを確かにするためには、例えばラテックスビーズで、必ずこれとこれとの間にあるラテックスビーズの負の電荷を変えることによって、これとこれの間にあるものをエクソソームとしましょうみたいな指標ができるような気はします。

○一木委員　　分かりました。今の御発言は、エクソソームのゼータ電位の測定自体が結構難しいということですね。

○瀬尾委員　　難しいです。

○一木委員　　ありがとうございました。

○高倉部会長　　今の一木先生のところ、私も非常に興味があったのですが、ラボでも、イオン交換を使ったり、限外濾過を組み合わせ、ピュアなポピュレーションを取ろうという実験をかなりしているのですが、例えば今の測定条件、確かに塩濃度とか粒子の数によって違うということもそうですが、例えばこれで取られた活性機能を持たない負のゼータ電位というのは、絶対値でいうとどのぐらいの感じなのですか。マイナスの20とか30とかですか。

○瀬尾委員　　そうです。一応その前に、EV全体で、例えばゼータ電位が水の中でどのくらい壊れるかを調べてみて、そのときに8割5分ぐらいは残っていて、なので、取りあえず塩濃度が低い状態でも意外に安定だなという結果を得てまして、だけど塩を入れないでEVを測定するのも嫌なので、今は私たちでは10分の1、大体0.015MのNaClを用いて、そのときのゼータ電位を測っているのですが、大体マイナス30ぐらいです。

○高倉部会長　　なるほど。規格として、やはりそういう数字はすごく客観的になりますよね。条件を決めて、この辺りというのをね。その辺がこの専門部会の議論でどうなっていくのかというのは個人的にも興味はあるけれども、CTL EX0のほうは同じような条件で測ると、どのぐらいなのですか。

○瀬尾委員　　CTL EX0のほうは、マイナス15とかです。

○高倉部会長　　表面の性質が違うということで、たまたま負電荷が弱いところ

に活性を有している miRNA が濃縮されてたということなのですね。

- 瀬尾委員            そうです。
- 高倉部会長          なるほど。これは臨床に進まれるということで、興味深く見守っていきたいと思います。ありがとうございます。
- 瀬尾委員            ありがとうございます。
- 高倉部会長          そのほかにありますか。
- 山口委員            山口です。非常に興味深いお話をありがとうございます。2点ほど教えていただきたいのですが、まず1点目が、今の先生のほうはパーソナルユーズということで、その先生の方法を大量にスケールアップしていけるかどうかと、その辺の見込みについて教えていただけると有り難いです。
- 瀬尾委員            スケールアップは、実は可能だと思っています。というか、全く難しくないという、限外濾過さえうまくいけたら、多分何十リットルでもできます。その場合、私たちがやった実験では、CTLの場合で4Lまではやってまして、4Lで何も支障がなくできます。
- 山口委員            ありがとうございます。もう1点、in vivoのモデルの話で、非臨床は安全性試験をマウスモデルでやるべきではないかというお話があったのですが、幾つか再生医療からエクソソームの開発されている先生は、どちらかというヒト細胞を用いて開発されてきているので、そうすると、先生の御意見ですと、そういうマウスモデルを作る必要があるかと思うのです。
- 瀬尾委員            細胞はヒトです。in vivoの動物としてマウスを使っているだけで、用いている細胞がヒトのエクソソームの場合は、ヒトの細胞で、がん細胞でやります。
- 山口委員            ですから、その辺のところは、特に免疫制御などのときには、必ずしもヒト細胞をマウスに投与したときに、求める答えが出てこない可能性もあるかと思ひまして、そういう場合には、必ずしもそういうことでの安全性試験としては不要かなと思ったのです。もちろん、臓器の安全性は見ないといけないかもしれませんが。
- 瀬尾委員            分かりました。ありがとうございます。
- 高倉部会長          ほかにもあるかもしれませんが、次の講演がありますので、この辺りで。もし少し時間が余れば、後で受け付けたいと思います。次のプログラムに移りたいと思います。瀬尾先生、ありがとうございました。

<委員からの講演と意見交換：

「改変エクソソームの可能性と問題点」（華山副部会長）>

○高倉部会長 次に、華山副部長からの講演をお願いしたいと思います。  
「改変エクソソームの可能性と問題点」ということで、よろしく  
お願いします。

○華山副部長 ありがとうございます。華山です。お時間を頂きありがとうございます。  
私からは、エクソソームを利用した治療用製剤について考える上で、是非とも皆さんに御検討していただきたい、改変  
エクソソーム、またの名を人工エクソソームとか、デザイナーエク  
ソソームとも呼ばれておりますが、それについて我々の研究の  
紹介を交えながら話題提供をさせていただきます。

本日の瀬尾先生のお話、もしくは前回の落谷先生のお話で用い  
られているエクソソームというのは、基本的に天然由来のエクソ  
ソームであります。この天然由来エクソソームの利点としては、  
改変の手間と費用が不要であること、また、比較的安全性が高く、  
品質管理が比較的簡単といった点が挙げられると思います。

私が話をさせていただく改変エクソソームについては、その利  
点としては、標的の指向性を高めることができるということ、産  
生細胞を自由に選ぶことができるということ、従来 DDS が難しか  
った分子を積載させることができるといった点が挙げられます。  
改変エクソソームに関しては、現在世界的なトレンドになりつつ  
ありまして、近年ベンチャー企業が多数設立されている状況であ  
ります。特に、米国の Codiak Biosciences 社などが研究を進めて  
いる段階です。

一方で、その欠点としては、これらの正に裏返しでして、天然  
エクソソームにおいては、標的の指向性が低かったり、産生細胞  
が限られていたり、積載物を制御しにくいということです。改変  
エクソソームにおいては、改変の手間と費用が必要、改変方法に  
より規制が必要、さらには品質管理に注意が必要といったこと  
です。これらの点に関して、本専門部会において、十分に議論を頂  
ければと思っております。

エクソソームの改変方法は大きく分けて2つあります。1つ目は、  
このエクソソームの産生細胞自体を遺伝子操作して、その細胞か  
ら放出されるエクソソームをいろいろと変化させてやるというこ  
とです。いろいろな方法がありますが、そういうことによって、  
適宜変化をもたらしたデザイナーエクソソームというものを作っ  
て創薬へと導いていこうという方法です。それに加えて、もう 1  
つの方法においては、エクソソームを精製した後でいろいろと人  
工的に試験管内で修飾させていく方法、この2つが代表的な方法

として挙げられます。

我々が現在採用している方法としては、エクソソームの代表的なマーカーの1つであるテトラスパニン、CD63などがありますが、このテトラスパニンとのキメラ分子を作製することによって、目的の分子を発現させます。例えばこの赤色の箇所には細胞の外に発現させられるようなタンパク質を載せられますし、この緑の箇所においては、エクソソームの内側に発現させるような分子を載せることができるという方法を採用しております。

そこで、現在我々が行っている改変エクソソームなのですが、この技術を用いて、エクソソーム上に複数の免疫制御分子を同時に発現させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現できないような革新的な免疫制御法の実現を目指しております。すなわち、免疫細胞の効率的な活性化には複数のシグナルが同時に入る必要がありますが、従来の免疫制御法では生体内で分散してしまいます。その結果、目的の免疫細胞、例えばこの場合ではオレンジの細胞ですが、これを効率的に活性化できないばかりか、目的外の免疫細胞も非特異的に活性化してしまい、様々な副作用が引き起こされてしまいます。一方、本技術では、エクソソームの特異的マーカーであるテトラスパニンとのキメラ分子を作製することで、目的の分子を自在に1つのエクソソーム上に発現させて、生体内で同時に運ぶことで、目的の免疫細胞のみを特異的に活性化させることが可能となります。

まず1つ目は、抗腫瘍免疫増強法の開発について説明します。エクソソームに抗原提示細胞様の機能を持たせるために、T細胞の活性化に必要ながん抗原とMHC複合体、さらには補助刺激分子CD80、また、IL-2やIL-15などの増殖因子とテトラスパニンとのキメラ分子を作製し、HEK293細胞に過剰発現させることで、各キメラ分子をエクソソーム上に発現させます。これを人工抗原提示エクソソーム(APExo)と名付け、特に細胞傷害性T細胞を活性化させるという意味でCTLと命名しております。我々は、このAPExo(CTL)が担がんマウスによって、がん細胞特異的CTLのみを活性化し、がんの縮小を引き起こすかを検討しております。

まずは、モデル抗原であるオボアルブミンをエクソソーム上に載せて実験を行いました。このAPExo(CTL)と、オボアルブミンに特異的に反応するCD8陽性T細胞、すなわちOT-I細胞とを共培養したところ、期待どおり強いT細胞の活性化が見られました。さらにOT-I細胞を移入したコンジェニックマウスに、この

APExo(CTL)を静脈内に投与したところ、OT-I 細胞のみを特異的に活性化し、他の T 細胞は全く活性化しないことが判明しました。一方、比較として、がん免疫増強剤として期待されている IL-2 スーパーアゴニストを投与したところ、OT-I 細胞のみならず、他の T 細胞も非特異的に活性化したり、重篤な炎症反応が引き起こされました。

次に、担がんマウスを用いた実験を行いました。まずは、オボアルブミンを発現させたメラノーマ細胞を移入したマウスに OT-I 細胞を移入した後、計 3 回、APExo(CTL)又はコントロールのエクソソームを投与します。御覧のとおり、n=3 による実験を 2 回行ったところ、いずれの場合においても、APExo(CTL)が強くがんの増殖を抑制することが明らかとなりました。

さらに、我々の目的は、T 細胞を外から移入させることなく、内在性の T 細胞を特異的に活性化させることにあります。そこで、担がんマウスに APExo(CTL)やコントロールエクソソームを投与した後に、末梢血リンパ球を調べたところ、APExo(CTL)が内在性のオボアルブミン特異的 CD8 陽性 T 細胞を増殖させていることが確認できました。そして、先ほどと同様に、担がんマウスモデルを用いて、この内在性 T 細胞による抗腫瘍免疫効果を調べてみたところ、期待どおり、APExo(CTL)の投与によって非常に強くがんの増殖を抑制することが分かってきました。

2 つ目は、逆に、抗原特異的制御性 T 細胞の分化誘導による自己免疫性療法の開発を行っております。現在、培養系でナイーブ T 細胞に IL-2、TGF- $\beta$ 、抗原刺激を与えることで、制御性 T 細胞の分化誘導が引き起こされることが知られています。そこで、これらの分子を同時に発現する APExo(Treg)を作製することで、生体内で効率的に抗原特異的制御性 T 細胞の分化誘導を行います。抗原には、モデル抗原に加えて、自己免疫抗原として MOG ペプチド、アレルギー抗原として Derp1 ペプチド、ダニのアレルギー抗原ですが、これらを用いることで、これらの抗原による疾患モデルマウスで、自己免疫やアレルギーが特異的に抑制されるかを検討します。

実際に作製してみますと、TGF- $\beta$  を載せることに非常に苦労しました。そこで、テトラスパニンの代わりに、エクソソーム結合性タンパク質である MFGE8、高倉部会長も用いておりますが、それとのキメラ分子を作製することで、エクソソーム上に高発現させることに成功しました。さらに、この APExo(Treg)とオボアルブ

ミン特異的 CD8 陽性 T 細胞とを共培養したところ、制御性 T 細胞の分化誘導が確認できましたので、生体内投与において、Treg の活性化や増殖効果を検討していきたいと思っております。

これらの技術を応用することで、原理的には、2つの細胞の機能を併せ持つエクソソームを作製することも可能です。すなわち、例えば通常、ナイーブ B 細胞はリンパ濾胞において、樹状細胞からの刺激とヘルパーT細胞からの刺激をそれぞれ受けることによって、プラズマ細胞へと分化します。そこで、これらの B 細胞活性化分子を同時に発現させたエクソソームを作製させることで、これらの細胞を非存在下でも抗体の産生を誘導することが可能になると考えられます。例えば、応用例として、インフルエンザウイルスのワクチン開発において、ウイルスの亜型間で保存されているヘマグルチニンの茎部に対する抗体の作製が試みられておりますが、抗体ができにくく非常に困難であります。そこで、この茎部を発現させた B 細胞活性化エクソソームを作製することで、万能インフルエンザワクチンの開発ができるようになるのではないかと考えております。

最後に、改変エクソソームの利点と問題点をまとめさせていただきます。利点としては、改変が非常に容易であるということ、さらには、細胞を用いた治療法に比べて、拒絶がないとか、がん化しないとか、中止がいつでも可能といった利点があります。一方、問題点としては、産生細胞をどのように選定するのかということです。我々は HEK293 細胞を用いていますが、それが本当に適切であるのかどうかということも考えなければなりません。また、天然と比べまして、この改変エクソソームというのは、品質管理がやはり非常に重要です。我々の場合でいうと、複数の分子を発現させておりますが、それが本当に 3 つとも載っているのか、実際に均一であるのかとか、効果が本当に全てのエクソソームに得られているのか、逆に抑制の方向に働いてしまうようなエクソソームが産生されていないのかとか、そういった品質管理が非常に重要になってくるかと思えます。また、産生量をどのように向上させていくのかといったことも重要な課題ですし、体内局在、これらのエクソソームがどこへ行くのかということ、これを制御する方法もやはり開発していかなければならないと思っております。私からは以上でございます。ありがとうございました。

○高倉部会長

華山先生、どうもありがとうございました。改変エクソソームについて、非常に興味深い話であり、高機能化していくためには、

これを改変することが研究的には必要ですし、最後は特に問題点を整理していただきましたが、この専門部会で話し合っていないかなくてはいけないテーマだったと思います。それでは、御質問等ございましたらよろしくお願ひします。

○吉岡委員 吉岡です。質問よろしいでしょうか。多分、3回投与していると思うのですが、1回の投与についてどのくらいのエクソソーム量を投与した結果なのでしょうか。お聞きしたかったのは、結構量を打たないといけないのか、もしそうであれば、私も昔、改変エクソソームを研究したときに、AMEDで研究費を申請する際に言われたのが、用意するのにどれくらいの培養液が必要で、それが本当に工業的に利用ができる量なのかと毎回言われてしまって。

○華山副部長 そうですね、はい。

○吉岡委員 先生の問題点で挙げられているのと同じだと思うのですが。

○華山副部長 おっしゃるとおりです。ありがとうございます。これはマウスにおいては、1回投与に必要な量は50 $\mu$ gですので、15cmディッシュにおける培養で、1枚分から調達が可能です。ところが、これがヒトになってきますと、例えば150枚分ぐらいの非常に大量な培養が必要になってきます。

私もAMEDから同じような質問を受けまして、我々は、やはりまずトランジェントで作るのではなく、ステイブルで作ることによって細胞を安定的に供給できるような体制を作ること、また、先ほど瀬尾先生からありましたように、培養を上手く行うシステムを導入することによって、特に293細胞においても293Fという浮遊系の細胞がありますので、それらを用いることによって大量に常に培養することができます。さらに我々は最近、エクソソームの分泌促進剤というものを幾つか同定しておりまして、その促進する低分子化合物を投与することによって、エクソソームの産生量を10倍上げることができるといったものが得られております。ですので、10倍上げる促進剤を加えながら細胞を培養すると、150枚必要だったものが15枚程度でできるようになると考えています。

○吉岡委員 ありがとうございます。

○高倉部長 それでは、秋吉先生、どうぞ。

○秋吉委員 ありがとうございます。いつも興味深い研究をありがとうございます。ちょっと確認ですが、こういう系で何種類か同時に載せることになる、やはりエクソソーム上に本当に全部一緒に載っているかということに関しての証明が難しいかと思うのですが、

これはイメージサイトか何かで見られたということですか。

- 華山副部長 おっしゃるとおりです。やはり、それぞれの発現分子が、ちゃんと同じエクソソームに載っていることを確認するというステップが少し面倒かなというのは感じております。ですので、先ほど言いましたように、ステイブルの細胞を作って、そのステイブルの細胞がきちんとその機能分子を同時に発現するエクソソームを作るといったことの確証が必要になってくるかなと思います。
- 秋吉委員 12枚目でしたか、先生がイメージングサイトのデータを出しておられますが、大体のエクソソームの中でどれぐらい全部載ったものができるのでしょうか。
- 華山副部長 遺伝子導入の効率にもよると思うのですが、感じとしては、8割からそれぐらいのエクソソームには載っているという印象です。
- 秋吉委員 実際、臨床で用いるときには、発現分子が載っていないエクソソームも含めて使うということでしょうかね。
- 華山副部長 はい。
- 秋吉委員 そこまで分けるとなると、今は技術がそこまでないですね。
- 華山副部長 そうですね。おっしゃるとおりでして、全てを精製してくるというのは非常に難しいプロセスになってきます。
- 秋吉委員 どこまで正確にキャラクタリゼーションされているということが重要なのでしょうか。今現在は、装置の技術がかなり上がっているということですかね。
- 華山副部長 現在フローサイトメトリーが非常に進んでおりまして、エクソソーム等を1粒子レベルで解析することも可能になってきておりますので、そういったフローサイトメトリーを用いることによって、機能分子の発現というのをきちっと1粒子レベルで担保していくのがよいのではないかと考えております。
- 秋吉委員 先生は、その測定を行われたのですよね。
- 華山副部長 はい。
- 秋吉委員 それはイメージングフローサイトでやられたということですか。
- 華山副部長 いや、それはイメージングフローサイトという高額なものを使ったわけではありません。
- 秋吉委員 普通のものでできますか。
- 華山副部長 ソニーとか、ベックマンとか、幾つかの会社はかなり100ナノよりも小さい粒子でも検出できるようになってきておりますので、そちらを用いるとできると思います。
- 秋吉委員 近年装置が急速に進歩しており、昔とは違ってということですかね。

- 華山副部長　そうですね、はい。
- 秋吉委員　分かりました。ありがとうございます。
- 高倉部会長　そうでしたら、石井先生、どうぞ。
- 石井委員　国衛研の石井です。大変興味深いお話をありがとうございました。吉岡先生の質問とも関連するのですが、投与量は $\mu\text{g}$ で御説明くださったのですが、何の量を測定した値になりますでしょうか。
- 華山副部長　ちょっとお待ちください。パッとデータが出てこないのです。
- 石井委員　瀬尾先生も $\mu\text{g}$ で御説明くださっていたのですが、エクソソームの量を $\mu\text{g}$ で表示するというのは、実際には何の量なのでしょう。
- 華山副部長　中に含まれるタンパク質によるのですが、でも基本的には、精製の純度にも依存するかと思います。ですので、汚い精製の方法でやっていきますと、そういったタンパク量が上がってしまいますので、実際にエクソソームの数が低く見積もられてしまうようなことがあるかと思います。
- 石井委員　総タンパク質を定量した値ですか。
- 華山副部長　タンパクとは。すみません、もう一度お願いします。
- 石井委員　BCA法などで、タンパク質を測定して。
- 華山副部長　そうですね。タンパク量はBCAアッセイで測っております。
- 石井委員　分かりました。ありがとうございます。
- 華山副部長　ありがとうございます。
- 高倉部会長　黒田先生、では、手短にお願いします。
- 黒田委員　すみません。私も改変エクソソームもやっていて、トランスフェクションしたりして、結果、やはり回収したときに、秋吉先生とか吉岡先生と重なってくるのですが、要らないエクソソームも入ってくる、何パーセントとか。私も先生と同じ細胞を使っていたのですが、10%ぐらいの効率だったのです。そういう問題を克服するためには、細胞を変えるのがいいのか、何かそれだけを精製する方法をやっていくのがいいのか、先生の御意見があれば、是非お伺いしたいと思います。
- 華山副部長　正におっしゃるとおりでして、条件にもよると思うのです。ただ、我々の場合は機能タンパク質を発現させているので、例えばFLAGペプチドみたいなものを一緒に外に発現させておけば、それに対する抗体で精製するというのも可能なのではと思っております。一種の精製法としてそういったことを導入すると、純度の高い機能性EVが取れてこれるのではないかなと思っております。
- 黒田委員　分かりました。
- 高倉部会長　ほかにもあるかもしれませんが、それでは、講演の部はここで

終わりになります。華山先生、どうもありがとうございました。

○華山副部長 ありがとうございます。

<エクソソームを含む細胞外小胞（EV）を利用した治療用製剤に関する報告書の検討項目と執筆分担について>

○高倉部長 それでは、議事の2番目です。これが、この後作業をしていくのに非常に重要な議題になるわけなのですが、専門部会報告書の検討項目と執筆分担についてということで、進めさせていただきたいと思います。

第1回の専門部会で、報告書の検討項目について御議論いただきましたので、今回は検討項目の確認と、どのように執筆、ディスカッションを分担していただくかということについて検討したいと思います。資料3を画面共有いただけますか。ありがとうございます。それでは、分担について、順を追って皆さんの意見をお伺いしたいと思います。

資料3の次のページでしょうか、主要な項目として、最初はイントロダクションです。エクソソームの開発の現況と課題ということで、記述の論点はここに書いてあるとおりでして、本質は何かを議論して、フォーカスを明確にして、エクソソームの本質として規制の中でどう定義するかという、これは、対象は企業だけではなくて、PMDAの審査担当部が、審査や企業への助言において求められる情報やその考え方を整理していくということになります。

これについて、事前に事務局から案を皆さんにお知らせしていますので、この場で1つずつ確認していきたいと思います。この項目については、華山副部長と黒田委員、樋田委員、二木委員、そして私が担当ということで、担当は調査あるいはインプット、実際には報告書を書くというのではなくて、いろいろ意見を言う立場だと思うのですが、括弧内の方が実際に汗をかいていただく若手の先生で、吉岡先生にこのパートは執筆を御担当いただいてはどうかという案です。お名前が挙がっている先生、いかがでしょうか。華山先生、よろしいでしょうか。

○華山副部長 私もお手伝いさせていただきますので。

○高倉部長 そうですね、すみません。説明があまりよくなかったですね。皆で責任を持って中身を詰めていくという。

○華山副部長 はい。

○高倉部長 お願いいたします。黒田先生、よろしいですか。

- 黒田委員 喜んでお手伝いさせていただきます。
- 高倉部会長 樋田先生、よろしいでしょうか。
- 樋田委員 はい、務めさせていただきます。
- 高倉部会長 二木先生、よろしいでしょうか。
- 二木委員 やらせていただきます。よろしくお願いいたします。
- 高倉部会長 そうしたら、一応この案のとおり、最初のイントロダクション、吉岡先生、括弧が付いていますが、実際に御担当いただくということでもよろしいでしょうか。
- 吉岡委員 はい、よろしくお願いいたします。
- 高倉部会長 そうしましたら、イントロで全体のフォーカスを決める必要がありますので、ちょっと人数が多くなっていますが、こういう体制でやっていきたいと思えます。ありがとうございました。
- 2番目、製法開発と品質特性解析ということで、論点としては、目的とする有効成分、マイクロ RNA 等になってくると思うので、それにエクソソームに対する目的外のエクソソーム及びエクソソーム等以外の成分の混入をどのように捉えて制御していくべきか、不純物というべきかどうかという視点も含めて、2番目の項目でまとめるということで、4つの項目を挙げています。最初の項目、細胞バンクの樹立とその特性解析ですが、こちらはセルバンクの御専門の石井先生にお願いして、執筆も石井先生にお願いするという案になっていますけれども、石井先生、よろしいでしょうか。
- 石井委員 担当させていただきます。よろしくお願いいたします。
- 高倉部会長 ありがとうございます。次は、培養法とエクソソームの製造・精製です。これは未定としておりますが、具体的には、今日の講演の中にもありましたけれども、いわゆる製造・精製、これは工業的な観点も必要になってくると思えます。どなたかこれを担当してもいいという方がおられましたらお願いしたいのですが、もし手を挙げるのが難しいようでしたら、もう少し外部専門家の講演が必要ということであれば、後々調整してということでもいいのですけれども、御担当の立候補、あるいはもう少し情報をとることがございましたら、御意見をお願いしたいと思います。いかがでしょうか。
- 山口委員 高倉先生、よろしいでしょうか。
- 高倉部会長 山口先生、どうぞ。
- 山口委員 立候補しているわけではないのですが、培養法とエクソソームの製造・精製に関しては、海外の医療機器メーカーとかがかなり工業生産的な製造もやられているという論文等がありますので、

できればその辺のことを調査した上で、最終的にどう書いていけばというようにしてはいかがかなと思った次第です。以上です。

○高倉部会長      ありがとうございます。そうですね。1回目も Codiak 社だったかな、すごく大きなタンクでやっているとか、そういう製造の情報もありますし、もう少し調査をしてから御担当を、別に最初の素案の段階で全ての項目が埋まっている必要はありませんので、今、山口先生から示唆いただきましたように、少しほかのことを進めながら、培養法とエクソソームの製造・精製に関しては情報を整理してから決めるということにしたいと思います。御意見ありがとうございます。

○山口委員      ありがとうございます。

○高倉部会長      次の項目はエクソソーム特有の品質特性解析です。これは案として、工学的な評価ということで、今日も活発に御発言いただいた一木先生、秋吉先生に御担当いただいて、武内先生に執筆を担当していただくということを考えています。各先生方、いかがでしょうか。一木先生、よろしいでしょうか。

○一木委員      承知いたしました。

○高倉部会長      秋吉先生、よろしいですか。

○秋吉委員      承知いたしました。

○高倉部会長      武内先生、執筆担当をお願いしてよろしいですか。

○武内委員      分かりました。

○高倉部会長      ありがとうございます。そうしましたら、この項目の4番目、ウイルス・細菌・真菌のような感染因子の混入による感染症伝播リスクについての記載とその低減策の提示ということで、血液製剤のウイルス安全性という観点から、岡田先生と山口先生をお願いしたいというのが案です。岡田先生、よろしいでしょうか。

○岡田委員      結構です。

○高倉部会長      よろしく願いいたします。

○岡田委員      お願いいたします。

○高倉部会長      山口先生もよろしいでしょうか。

○山口委員      はい。今日もお話がありましたように、エクソソームの精製は割とウイルスの精製の技術も使えるところがあって、逆に言うとウイルスを濃縮してしまう工程にもなるので、その辺の評価を追記させていただければと思います。ありがとうございます。

○高倉部会長      ありがとうございます。それでは、次のスライドをお願いいたします。非臨床試験ということで、ここは項目が5つあります。まず最初の項目、アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫

反応の予測やその低減策ということで、三浦先生に御担当をお願いして、武内先生に御執筆という案を考えています。三浦先生、よろしいでしょうか。

- 三浦委員 承知いたしました。
- 高倉部会長 よろしく願いいたします。武内先生、よろしいですか。
- 武内委員 はい、よろしく願いいたします。
- 高倉部会長 お願いいたします。そうしますと2番目、生体内分布と目的外の臓器・細胞への望ましくない分布の評価方法につきまして、今日のお二人の講演の中でも触れられておりましたが、体内動態ということで、副部会長の華山先生が御担当で、瀬尾先生に御執筆をお願いするという案を考えています。華山先生、よろしいでしょうか。
- 華山副部会長 大丈夫です。
- 高倉部会長 瀬尾先生、よろしいですか。
- 瀬尾委員 よろしく願いいたします。
- 高倉部会長 そうしましたら、次の2つの項目、POC・薬理試験と安全性、毒性試験という所は未定ということに案の段階ではなっていますが、これについてはちょっと事務局と相談して、やはりPMDAの毒性担当の人からもう少し意見を聴取して、方針を決めてからという進め方をしたいと思います。その上で、委員のどなたかに担当、執筆をお願いするかということになるのですが、今の進め方で何か問題はありますか。よろしいですかね。
- 山口委員 山口です。よろしいでしょうか。
- 高倉部会長 山口先生、どうぞ。
- 山口委員 多分これは、先ほどちょっとお話がありましたように、再生医療をやっている人が割とエクソソームにも来ていたと思うのですが、そういうときに、やはりPMDAの再生医療製品等審査部のエキスパートに協力していただくのが非常にいいのかなと思っております。そういう意味では、高倉部会長がおっしゃったように、再生医療製品等審査部の毒性担当、非臨床担当のエキスパートに意見聴取をした上で、場合によっては少し原案ぐらいを書いていたければ一番有り難いなと思っております。
- 高倉部会長 なるほど、そうですね。
- 山口委員 はい。
- 高倉部会長 手伝っていただけると有り難いですよね。その辺の調整は、山口先生と事務局でお願いしてよろしいですか。
- 山口委員 分かりました。そのときに、これからお話があるのですが、多

分、安全性に関しては不純物も絡みますので、後でお話される不純物の所の安全性の方とちょっと議論させていただくといいのかなと思いました。

- 高倉部会長      そうですね。非常に密接に関係するので連携が必要ですよね。
- 山口委員      はい。以上です。
- 高倉部会長      ありがとうございます。そうしましたら、今ちょっと先に話が出ましたが、5番目の項目、品質での評価を踏まえた上での不純物の安全性ということで、こちらは三浦先生と武内先生にお願いしたいという案です。三浦先生、お引き受けいただけますか。
- 三浦委員      承知いたしました。
- 高倉部会長      そうしましたら、今の山口先生の御提案どおり、上の項目とも関係してきますので、連携しながらお願いいたします。武内先生、御執筆をお願いしてよろしいですか。
- 武内委員      はい、よろしくをお願いいたします。
- 高倉部会長      武内先生のお名前が何度も出てきましたが、よろしくをお願いいたします。
- そうしましたら、4番目、臨床開発です。1つ目の項目が、アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫反応ということで、先ほどの非臨床の最後の項目とも関係いたしますので、同じ三浦先生、武内先生にお願いしたいと思います。お二人の先生方、よろしいでしょうか。三浦先生、よろしいですか。
- 三浦委員      三浦です。前回、落谷先生のお話があって、今回お二人の先生のお話があって、EVの由来が違うという点と、改変エクソソームは全く別物かなという印象を持っているのです。十把一絡げに論じるのが難しいところがあると思うのですが、その辺を広くカバーして個々に言及するという形なのか、MSC EVを主に取り上げるのか、どういう感じでしょうか。
- 高倉部会長      重要な視点として、臨床開発というようにいきなりいってしまうと、残りの未定の項目もそうなのですが、やはりMSCに限るのか、その後も視野に置くのかということは、第1章で、ある程度範囲を絞らないと書き始めるのが難しいですよね。なので、ちょっとその辺りが決まってくるのをお待ちいただいても構わないと思います。対象が決まらないと、どのような免疫反応を考えたらいいのかということが、臨床開発というヒトでのそういう反応をなかなか議論しにくいと思いますので、取りあえず現時点で、三浦先生、武内先生にここの項目はお願いしたいということくらいでとどめておくのがいいと思います。

- 三浦委員           ありがとうございます。
- 高倉部会長       今、既に言いましたが、次の項目、PK、PD の話も今の時点では未定にしていますが、まずここで扱うエクソソームの範囲を決めていかないと、ということですので、最初のイントロダクションで、この報告ではどういう範囲を考えているかということがだんだんと煮詰まってきた段階で、PK、PD についても詰めていくということでもいいかなと思うのですけれども、この点について何か御意見はございますか。特に御異論がなければ、臨床開発については今、1 番目の項目はお名前を挙げていますが、基本的には最初の項目を決めて、報告書の大雑把なストラクチャーが決まってきたら、順次整理していくというような感じで進めていただきたいと思います。
- 以上、ほぼ担当等が決まりましたし、進め方についても今のお話したとおりでいいかと思いますが、進め方の案について何か追加の御発言等がございましたらお願いしたいと思います。
- 吉岡委員           高倉先生、吉岡です。
- 高倉部会長       吉岡先生、どうぞ。
- 吉岡委員           進め方とかではなく、培養法とエクソソームの精製についてなのですけれども、私は今まで工業ベースではやっていないのですが、培養とエクソソームの精製というのはいろいろやってきたので、もし私でお手伝いできるのであれば、執筆担当としてやってみようかなと思います。いろいろ工業用のデータとか資料はシェアしてほしいなと思うのですが、私ができる範囲で担当できればと思います。
- 高倉部会長       そういう積極的な発言は大歓迎です。ありがとうございます。そうしたら、先ほど山口先生から情報を集めると言っていただきましたが、それは出てきたらというか、それを並行して、吉岡先生のほうで 2 番目の項目の培養エクソソームの製造・精製は担当していただけるということで、もちろん皆で素案についてディスカッションしていきませんが、ここに吉岡先生の名前を入れさせていただきたいと思います。皆さん、よろしいでしょうか。特に反対の意見はないと思いますが、では、吉岡先生にここを御担当いただくということで進めたいと思います。それでは、今、御相談させていただいた担当で始めるということにさせていただきたいと思います。ありがとうございました。
- そうしましたら、早速なのですが、今の案に沿って作業を始めることになります。その他の議事はないのですが、今後の進め方

と、何かここまででありますか。よろしいですか。

○石井委員 高倉先生、石井ですが、よろしいでしょうか。

○高倉部会長 石井先生、どうぞ。

○石井委員 2. の製法開発と品質特性解析とも関連することとして、この専門部会の議論の中で、投与量の設定にもつながる、エクソソームの量の表示をどうするのかというのもすごく重要な気がしております。それで先ほど  $\mu\text{g}$  が何の測定値なのかをお伺いしました。その関連で、規格及び試験方法とか定量法に関する項目も必要ではないかなと思うのですが。

○高倉部会長 エクソソームの定量法。

○石井委員 定量法は規格及び試験方法に含まれますので、品質特性解析の議論が煮詰まってからでもいいのかもしれないのですが、御検討いただけたらと思います。以上です。

○高倉部会長 ありがとうございます。定量というか、一木先生と秋吉先生が担当している所で品質特性解析をやるので、通常どこのラボでもエクソソームを分離してきたら、トータルのそれに含まれている膜タンパクであるか中に入っているタンパクとか関係なしで、クルードなタンパク量を測って、量として、細胞に添加するときも、動物にするときも、その  $\mu\text{g}$  をベースに投与すると。それで、1粒子当たりどの程度のタンパクがあるかを別途見積もっておくと、大体、粒子数にしてどれぐらいになるのかということは出てきますが、どちらにしてもすごくヘテロなものなので、厳密に MSC のものをヒトに投与するというような設定を考えますと、そうですね、その辺りのことをどうするかというのは、ここの工学的な評価に入ってきますかね。品質特性を解析するとき、まずエクソソームを粒子として考えたときに、タンパク量を基準にするとか、どうですかね、その辺りは別の項目を求めたほうがいいですか。私、この報告書のまとめ方のイメージがあまりできていないのですが。

○山口委員 山口ですが、よろしいでしょうか。

○高倉部会長 山口先生、お願いします。

○山口委員 石井先生が気にされているのは、特性解析だけではなくて、恐らく非臨床の POC のところから臨床にかけて、どれだけの投与量を設定していくかというのが非常に重要なポイントになるので、投与量の設定のための力価というところをどう結び付けていくかという、そういう議論が必要になってくるかなと思います。割と開発初期から投与量というのは非常に重要なポイントになります

ので。投与量をこれで決めないといけないということではなくて、生物活性でやる場合もあるし、物理量でやる場合も当然あるかと思えます。ただ、その辺の考え方を書くというのは非常に重要なことだと思います。以上です。

- 高倉部会長      ありがとうございます。そうすると、今のスライドの2番の所で、ここでいうエクソソームの定量的な物質か、後でどこかの項目で出てくるのですかね、いわば有効成分というか、マイクロRNAとかタンパクとか、そういうことについては品質特性なのですか。
- 山口委員      もちろん、品質特性で決めるのですが、その設定方法の考え方をどこかに書くということが必要なのかなと思います。
- 高倉部会長      考え方ね。
- 山口委員      はい。
- 高倉部会長      石井先生、そうしたら、どうしておいたらいいでしょうか。
- 石井委員      規格及び試験方法についても必要に応じて記載する、というようなメモをどこかに残しておいていただければ、この専門部会の議論の後半のほうで書き込んでいけるかと思えます。
- 高倉部会長      なるほど。そうしたら、今、石井先生が言われたことをメモしていただけますか。規格に関して、試験法ですね、こういう方法でタンパク質を測るとか、後に *in vitro* とか *in vivo* で評価するときに、投与量というかそういうものを、何をベースにして考えるかというところの考え方ですね。
- 石井委員      そうですね。そこが最終的に重要で、あとは確認試験や純度試験に関しても書ける範囲で書いておくと、今後開発される方の役に立つのではないかと思います。
- 高倉部会長      ありがとうございます。そうしたら、論点として置いていただいた規格とか試験法についても、どのように入れ込むかはあれですが、今の話はやはり大きな2番の所ですよね。そういうことで、それをどのように入れるかは、作業を進めながら入れていくということで、現時点ではメモを追加していただきました。やはり考え方ですね。物質なのか力価なのか、ここで使うエクソソーム製剤をどんなものとして捉えるかという考え方を、この大きな2番の所で入れ込んでいくということにしておきたいと思えます。
- 一木委員      一木ですが、ちょっとよろしいですか。
- 高倉部会長      一木先生、どうぞ。
- 一木委員      今の所に関して、今回エクソソームの評価というか、エクソソームについての話をしていますが、再生医療の話とかバイオ医薬

品とか、関連の深いもののいろいろな安全基準とか評価基準が既にあると思うので、そういったものを連動させるべきだと思うのですが、これは事務局かどちらかで調整いただけるということでよろしいのですか。

○高倉部会長      いかがですか。山口先生に聞いたらいいのでしょうかね。ほかの再生医療等製品とかバイオ医薬で、今の規格なり試験法で、ほかのものについての今の話題、考え方も含めて、参考というか、書き方。

○山口委員      ありがとうございます。例えばバイオはガイドラインが非常にきちんと整備されているのですが、再生医療等製品についてもかなり経験が積まれてきていますので、どのように試験をするべきかというのは、かなりガイドラインとして整備されてきております。ただ、エクソソームに関してはこれから開発されてくるものなので、もちろんそれを参考にするのはいいと思うのですが、今、科学委員会から求められているのは、考え方を示すのが重要であって、ガイドラインを作ることまでは多分求められていないと思うのです。ですから、これを土台にして、例えば将来ガイドラインをどう作っていくかという、そういう時点での考え方が、科学委員会からエクソソーム専門部会に求められていることかなと理解しております。

○高倉部会長      なるほど。では、それぞれのガイドラインがどうなっているかというのを確認した上で、考え方を議論すると。

○山口委員      それはそれで結構だと思います。是非そういうところで参考になるものは使うのですが、必ずしもうまく適合しない部分はむしろそちらに引きずられないで、やはりエクソソームの専門家として考えていただいたものを記載していただくほうがいいのかと思います。

○高倉部会長      なるほど。バイオとか生体由来のものが、既に進んでいるものがどうなっているかは、ちょっと御担当の先生方にその辺りの規格とか試験法についてそちらのほうはどうなっているかというのを提供してもらって、それを参考にするのではなくて、そういうガイドラインの基になるエクソソームに対する考え方をここでは議論するというフォーカスで作業をしていただくということによるのでしょうか。では、事務局から必要な資料を御提供いただけますか。

○事務局（澁岡先端技術評価業務調整役）      かしこまりました。

○高倉部会長      ありがとうございます。そのほか、何か御発言はございますか。

よろしいですか。

<今後の進め方等について>

○高倉部会長　　そうしましたら、この後の進め方について御説明したいと思います。来年1月開催の第3回以降に、報告書の各素案について専門部会にて意見交換を行う予定にしております。今日は2回目、来年1月まで時間があるので、それまでに今日御担当をお願いしたもので作業を始めていただきたいと思います。

それで、11月10日(水)ですが、第1回のワーキンググループのミーティングがあります。そこでは、今日御担当をお願いした先生方に、担当項目の概要案というのを御説明いただきたいと思います。執筆担当でない先生方には、調査とインプットをお願いする形になりますし、ワーキングに出席されるかどうかというのは可能な範囲で結構なのですが、事前に案を作っていましたら、メールベースでディスカッションをお願いしたいと思います。そこには担当委員、括弧の先生にたたき台を作ってくださいと思うのですが、それを皆さんでメールでやり取りしていただいてディスカッションをして、11月10日のワーキング、これはまた別に案内が行きますけれども、そこで議論する資料を作成していただきたいと思います。もし必要でしたら、担当グループ全員でのWeb会議も事務局で設定いただけるということです。メールとWeb会議を適宜組み合わせる作業を進めていただければと思います。

今日、括弧付きで名前を挙げさせていただきました執筆をお願いした先生方には、もちろんほかの先生もメールでやり取りしながら手伝っていただくと思うのですが、中心になっていただくのは執筆御担当という名前を挙げた先生なのですけれども、お忙しいところ誠に申し訳ないのですが、繰り返しになりますが、同じ担当項目グループの先生方とメールベースで相談していただいて、素案の作成を開始いただくということです。11月10日に間に合うには、まず10月29日、今月末までして1か月はありませんが、3週間強あります。10月29日(金)までに、事務局に素案を提出いただきたいと思います。もし、作業をやられる中で、執筆上御不明な点がありましたら、私あるいは事務局に遠慮なく御連絡ください。先ほども言いましたが、適宜ワーキング形式のWeb打合せなどを活用しながら作業を進めていただければと思います。

それで、来年1月17日に予定されています3回目の専門部会で

は、各素案のコンセプトを御発表いただいて、項目の充足性、外部有識者の講演を設定する必要があるかどうかなどについて検討したいと思います。以上が今後の予定についての説明ですが、何か御質問等がございますか。

○吉岡委員 吉岡です。度々すみません。素案はどの程度のレベルまでのものを作り上げればいいのかというのを伺いたくて、例えば、箇条書きでこういう項目を書きますというような程度でいいのか、もう少し文章チックにまとめたほうがいいのかというのを教えていただければと思います。

○高倉部会長 どなたかアドバイスを頂けますか。私は作業をしたことがないので正確には。やはり最初は箇条書きでこういう内容に触れようというようなスタートがよろしいかなと個人的には思うのですが、御経験のある先生、いかがですか。

○山口委員 よろしいでしょうか。山口です。

○高倉部会長 すみません、山口先生。

○山口委員 多分、担当される部門によってかなり違ってくるのかなと思うのです。というのは、高倉先生が担当される第1章の所というのは、割とエクソソームに関するいろいろな知識を、どのように開発されてきて、今後どうなっていくかという、そういうイントロダクティブな所なので、専門家にとっては割と書きやすいのかなと。だから、文章になる可能性も高いのかなと思いました。一方、品質とか非臨床は、特定項目が幾つか想定されるものがありますよね。そういう所は箇条書きのほうが最初のスタートは割とやりやすいかなと思いました。以上です。

○高倉部会長 貴重なアドバイスをありがとうございます。

○吉岡委員 ありがとうございます。

○高倉部会長 今ので大体感じは分かりましたか。

○吉岡委員 分かりました。イントロダクションの部分はこんな感じでというのは作ってみます。

○高倉部会長 そうですね。最初の所は、今おっしゃったように、文章でいきなりバーツといろいろなことを書いていくのが、吉岡先生の御担当の所はあれですし、先ほど挙げていただいた培養法の所などは箇条書きでしょうかね。

○吉岡委員 そうですね。項目を諸々挙げて、こういうことを書きますというような感じで書いてみます。

○高倉部会長 そうですね。それで、何か漏れていることはないかというような進め方で、項目が揃ったら、文章で肉付けしていくというよう

な感じですかね。

○吉岡委員           はい。

○高倉部会長       ありがとうございます。ほかに何かございますか。ないようでしたら、本日の用意しました議事は以上です。事務局からほかに何かございますか。

<その他>

○事務局（澁岡先端技術評価業務調整役）   ありがとうございます。1点、事務局より御報告させていただきたいことがあります。資料を共有いたします。参考資料2ですが、本専門部会を紹介する記事を事務局で作成しまして、『British Journal of Clinical Pharmacology』という雑誌に、Letter to the Editorとして投稿したところ採択されまして、このような形で公表されましたので報告いたします。この雑誌は、EMAガイドラインシリーズを掲載する雑誌ということで、グローバルな薬事関係者の目に触れるようなものになるかと思えます。本専門部会の国際的な認知度向上に資するものと考えましたので、御報告した次第です。以上です。

○高倉部会長       ありがとうございます。事務局から、グローバルな情報発信ということで、日本のPMDAがこのようにEVの専門部会を立ち上げて進めるということを発信していただきました。

○事務局（澁岡先端技術評価業務調整役）   次に、次回の専門部会についてです。1月17日(月)午後2時から午後4時までの時間での開催を予定しております。詳細については追って御連絡させていただきます。以上です。

<閉会>

○高倉部会長       それでは、本日の専門部会は、以上で終了させていただきたいと思えます。どうもありがとうございました。